

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

16.05.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 4月 8日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-105240

[ST.10/C]:

[JP2002-105240]

出 願 人

Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

REC'D. 04 JUL 2003

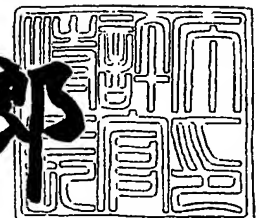
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月19日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3047736

| | |
|----------|-----------------------------------|
| 【書類名】 | 特許願 |
| 【整理番号】 | TKS-4734 |
| 【提出日】 | 平成14年 4月 8日 |
| 【あて先】 | 特許庁長官殿 |
| 【国際特許分類】 | C12N 15/09 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 兵庫県神戸市西区伊川谷町潤和 8 9 1 - 4 - 2 0 2 |
| 【氏名】 | 長岡 哲也 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6 - 3 1 - 1 7 三青荘 |
| 【氏名】 | 横溝 聡 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 兵庫県明石市別所町 1 2 - 3 2 メゾン別所 2 0 1 号 |
| 【氏名】 | 宮本 憲二 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 岡山県岡山市大安寺東町 1 7 - 7 |
| 【氏名】 | 小坂田 史雄 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 兵庫県西宮市大森町 1 1 - 3 3 |
| 【氏名】 | 松本 圭司 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 東京都府中市栄町 1 - 3 1 - 1 0 |
| 【氏名】 | 高木 正道 |
| 【発明者】 | |
| 【住所又は居所】 | 埼玉県さいたま市プラザ 5 7 - 2 |
| 【氏名】 | 太田 明德 |
| 【特許出願人】 | |
| 【識別番号】 | 000000941 |
| 【氏名又は名称】 | 鐘淵化学工業株式会社 |

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規プロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）～（c）いずれかのDNAからなるACT1遺伝子プロモーター。

（a）配列番号9で示されるDNA。

（b）配列番号9で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

（c）配列番号9で示される塩基配列において、少なくとも1個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

【請求項2】 請求項1記載のACT1遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなるDNA。

【請求項3】 請求項2記載のDNAとターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

【請求項5】 プラスミドがpUTA-ACT1-ORF2Sである請求項4記載のプラスミド。

【請求項6】 以下の（a）～（c）いずれかのDNAからなるGAP3遺伝子プロモーター。

（a）配列番号10で示されるDNA。

（b）配列番号10で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

（c）配列番号10で示される塩基配列において、少なくとも1個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNA。

【請求項7】 請求項6記載のGAP3遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなるDNA。

【請求項 8】 請求項 7 記載の DNA とターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

【請求項 9】 請求項 8 記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

【請求項 10】 プラスミドが pUTA-GAP3-ORF2S である請求項 9 記載のプラスミド。

【請求項 11】 以下の (a) ~ (c) いずれかの DNA からなる PMA1 遺伝子プロモーター。

(a) 配列番号 11 で示される DNA。

(b) 配列番号 11 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(c) 配列番号 11 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

【請求項 12】 請求項 11 記載の PMA1 遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなる DNA。

【請求項 13】 請求項 12 記載の DNA とターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

【請求項 14】 請求項 13 記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

【請求項 15】 プラスミドが pUTA-PMA1-ORF2S である請求項 14 記載のプラスミド。

【請求項 16】 以下の (a) ~ (c) いずれかの DNA からなる TEF1 遺伝子プロモーター。

(a) 配列番号 12 で示される DNA。

(b) 配列番号 12 で示される塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DNA。

(c) 配列番号 12 で示される塩基配列において、少なくとも 1 個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含み、かつプロモーター活性を有する DN

A。

【請求項 17】 請求項 16 記載の TEF1 遺伝子プロモーターと、そのプロモーター配列の下流に連結された構造遺伝子からなる DNA。

【請求項 18】 請求項 16 記載の DNA とターミネーターからなる遺伝子発現ユニット。

【請求項 19】 請求項 18 記載の遺伝子発現ユニットを含んでなるプラスミド。

【請求項 20】 プラスミドが pUTA-TEF1-ORF2S である請求項 19 記載のプラスミド。

【請求項 21】 宿主細胞に、請求項 2, 7, 12 または 17 記載の DNA を導入した形質転換細胞。

【請求項 22】 宿主細胞に、請求項 4, 5, 9, 10, 14, 15, 19 または 20 記載のプラスミドを導入した形質転換細胞。

【請求項 23】 宿主細胞がキャンディダ・マルトーサである請求項 21, または 22 記載の形質転換細胞。

【請求項 24】 構造遺伝子がアエロモナス・キャピエ (*Aeromonas caviae*) 由来の 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) の合成に参与する酵素遺伝子である請求項 21~23 いずれか記載の形質転換細胞。

【請求項 25】 請求項 21~24 記載の形質転換細胞を培養する、共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、キャンディダ属酵母において遺伝子発現を可能にするプロモーターに関する。詳しくは、キャンディダ属酵母において、培養条件や培地条件等の誘導条件に依存することなく構成的且つ高効率に有用遺伝子を発現できるプロモーターに関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子組換え技術の発展に伴い、微生物を用いて有用蛋白質並びに有用化学品等の生産が行われてきた。原核生物である大腸菌や枯草菌を用いた遺伝子組換え系の開発が積極的に進められ、その中でも、特に大腸菌の宿主・ベクター系を用いて様々な有用物質の生産が行われている。しかし、大腸菌において生産される蛋白質は菌体内で不溶性顆粒を形成することがあり、また、真核生物において特徴的な糖鎖付加を行うことができないなどの問題もあった。

【0003】

これに対して真核生物である酵母を宿主とした系の開発も進められた。酵母は古くから醸造や製パンに利用されており、またかつて飼料用として生産された経験もあり、高い安全性が保証されている。また、生産される蛋白質に糖鎖付加を行うことも原核生物とは区別される特徴である。

【0004】

遺伝学的知見が豊富なサッカロマイセス・セレビジェの他、シワニオマイセス属、クルイベロマイセス属、ピキア属、ハンセヌラ属、ヤロウイア属、キャンディダ属において、宿主・ベクター系が開発されている (Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Klaus Wolf 著, Springer 出版)。

【0005】

これらの酵母の中には、直鎖炭化水素鎖 (n-アルカン) が唯一の炭素源であっても生育できるものがある。キャンディダ属のキャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) などや、ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) などである。これらの酵母はn-アルカンの末端を酸化する酵素系をもち、酸化によって生じた長鎖カルボン酸を、ペルオキシソームの β 酸化系によってTCAサイクルの基質となるアセチル-CoAにまで分解し、エネルギー源として利用することができる。

【0006】

n-アルカン酸化性酵母は直鎖炭化水素を炭素源として生育するばかりでなく、通常の酵母の生育を阻害する疎水性物質に耐性であり、疎水性化学物質の変換による有用物質の生産・反応の場を提供する宿主としても有望である。したがって、このような酵母における遺伝子発現系を構築することによって、有害な副産物を生み出さず、エネルギーを浪費しない、新たな有用化学物質生産系を構築することができる。

【0007】

n-アルカン酸化性酵母のうちキャンディダ・マルトーサにおいて、遺伝子発現系の構築が積極的に行われてきた。M. Kawamuraらはキャンディダ・マルトーサより高効率形質転換の原因領域 (Transformation ability: 以下TRAと略す) を見出した (M. Kawamura, et al., Gene, vol 24, 157, (1983))。この領域にはキャンディダ・マルトーサにおいて自律的複製に関わる配列 (Autonomously replicating sequence: 以下ARSと略す) およびセントロメア配列 (以下CENと略す) を含んでいることが判った。現在までにTRA全領域を有する低コピーベクターと、導入遺伝子高発現が期待できるCEN領域を除いた高コピー数ベクターが開発されている (M. Ohkuma, et al., Mol. Gen. Genet., vol 249, 447, (1995))。

【0008】

キャンディダ・マルトーサにおける遺伝子発現のためには同酵母内で機能するプロモーターが必要であり、複数のプロモーターが利用可能になっている。キャンディダ・マルトーサはn-アルカン酸化系の酵素をアルカンの存在下に高生産する。特にアルカンの初発酸化を行うチトクロームP450をコードする遺伝子 (以下ALKと略す) は強く誘導され (M. Ohokuma, et al., DNA and Cell Biology, vol 14, 163, (1995))、また β 酸化系の酵素をコードする遺伝子の転写も誘導される (Y. Masuda, et al., Gene, vol 167, 157, (1995))。ALK遺伝子群のうちALK1遺伝子のプロモーターは、n-アルカンによって最も

強く誘導され、遺伝子発現に利用することができる。また、脂肪酸存在下ではALK2やALK5遺伝子のプロモーターが適している。

【0009】

解糖系の酵素として知られているホスホグリセリン酸キナーゼ（以下PGKと略す）のプロモーターは、グルコースの存在下で強力な遺伝子発現を誘導することが知られている。キャンディダ・マルトーサのPGKプロモーターがY. Masuda等によってクローニングされた（Y. Masuda, et al., Curr. Genet., vol 25, 412, (1994)）。更に、ガラクトース存在下において強力な遺伝子発現誘導活性を有するGALプロモーターもクローニングされた（S. M. Park, et al., Yeast, vol 13, 21 (1997)）。このようにしてクローニングされたALKプロモーター、PGKプロモーターやGALプロモーターはキャンディダ・マルトーサにおける遺伝子発現に利用することができる。

【0010】

しかしながら、ALKプロモーターはブドウ糖等の炭素源を利用する場合にはほとんど機能せず、またPGKプロモーターは脂肪酸やn-アルカンを炭素源とした場合にほとんど機能しない。このためキャンディダ・マルトーサにおける有用物質の生産において、当該物質の生産に適した炭素源が必ずしも強力な遺伝子発現に適しているとはいえない。更にGALプロモーターはガラクトースを炭素源としたときにのみ誘導されることから、高価なガラクトースを利用しなければならない点で工業生産には適さないといえる。

【0011】

そこで、キャンディダ・マルトーサにおいて高効率な有用物質の生産のためには、炭素源の種類による制限を受けず、強力に遺伝子発現できる新規プロモーターが望まれていた。

【0012】

一方、サッカロマイセス・セレビジェではアルコールデヒドロゲナーゼ1遺伝子、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ3遺伝子（以下GAP3と略す）、PGK、GALのプロモーターなどが既にクローニングされ、異種遺

伝子発現用のプロモーターとして広く利用されており、同酵母を宿主とした場合にこれらのプロモーター活性が強力であることが判っている。そこで、キャンディダ・マルトーサを宿主とした場合でも高発現が期待できるが、キャンディダ・マルトーサのこれらのプロモーター領域遺伝子は未だクローニングされておらず、クローニングが待たれていた。

【0013】

しかしながら、キャンディダ属酵母は、サッカロマイセス・セレビジェとは異なり有性世代が知られておらず、多くは2倍体ゲノムを有している。また、その遺伝暗号読みとりにも異常があることも報告されている。キャンディダ・シリンドラッセ (*Candida cylindraceae*) (Y. Kawaguchi, et al., Nature, vol 341, 164 (1989)) やキャンディダ・マルトーサ (H. Sugiyama, et al., Yeast, vol 11, 43 (1995)) は通常ロイシンコドンにコードするCUGコドンをセリンとして読むことが報告されている。このように、キャンディダ属酵母はサッカロマイセス・セレビジェとは大きく異なる性質を有しているといえるため、サッカロマイセス・セレビジェ由来のプロモーター領域がそのままキャンディダ属酵母内で正常な調節且つ同等のプロモーター活性を有するかどうかは不明であった。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、キャンディダ・マルトーサにおいて炭素源の種類によって影響を受けることなく、かつ強力な遺伝子発現可能なプロモーターを構築することにより、構成的且つ高効率に有用物質生産を行うことができる新規プロモーターを提供するものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は鋭意研究を行った結果、キャンディダ・マルトーサのアクチン合成酵素1遺伝子(以下ACT1と略す)プロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ3遺伝子(以下GAP3と略す)プロモーター、原形

質膜プロトンATPase1遺伝子（以下PMA1と略す）プロモーター，翻訳伸長因子1遺伝子（以下TEF1と略す）プロモーターの配列を初めて同定し、それらプロモーターが、従来のALKプロモーター、PGKプロモーター、GALプロモーターと、同等或いはそれ以上のプロモーター活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0016】

すなわち本発明は、キャンディダ・マルトーサのACT1遺伝子プロモーター、GAP3遺伝子プロモーター、PMA1遺伝子プロモーター、そしてTEF1遺伝子プロモーターおよびその利用に関する。

【0017】

【発明の実施の形態】

キャンディダ・マルトーサ由来のACT1遺伝子プロモーター、GAP3遺伝子プロモーター、PMA1遺伝子プロモーター、そしてTEF1遺伝子プロモーターは、本発明において初めてその配列が同定された、新規なプロモーターである。以下、その詳細について説明する。

【0018】

(1) 新規プロモーターのクローニング

ACT1遺伝子は細胞骨格を構成するアクチンの合成に関与する酵素の一種、GAP3遺伝子は解糖系酵素の一種、PMA1遺伝子はサッカロマイセス属の酵母においては原形質膜蛋白の約10%を占めると言われる原形質膜蛋白の一種、TEF1遺伝子は蛋白質合成における翻訳伸長因子の1種であり、いずれのプロモーターもサッカロマイセス・セレビジェでは強力なプロモーターとして知られている。

【0019】

本発明においてキャンディダ・マルトーサのACT1遺伝子、GAP3遺伝子、PMA1遺伝子およびTEF1遺伝子のプロモーター領域をハイブリダイゼーション法によりクローニングするため、まず比較的近縁の属であるサッカロマイセス・セレビジェよりそれぞれ対応する構造遺伝子の部分DNA配列をPCR法で増幅し、プローブ断片として用いた。例えばサッカロマイセス・セレビジェの

ACT1 遺伝子配列は既に報告されている (Daniel, H. M. et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol 51, 1593 (2001))。その配列からサッカロマイセス・セレビジェの ACT1 遺伝子増幅用 PCR プライマーが合成できる。サッカロマイセス・セレビジェの GAP3 構造遺伝子配列は、既に報告されている (Holland, M. J. et al, J. Biol. Chem. vol 254, 5466 (1979))。その配列からサッカロマイセス・セレビジェの GAP3 遺伝子増幅用 PCR プライマーが合成できる。またサッカロマイセス・セレビジェの PMA1 遺伝子配列は Capieaux, E., et al, J. Biol. Chem. vol 264, 7437 (1989) により既に報告されている。その配列からサッカロマイセス・セレビジェの PMA1 構造遺伝子増幅用 PCR プライマーが合成できる。サッカロマイセス・セレビジェの TEF1 構造遺伝子配列は Cottrell, P., et al, J. Biol. Chem. vol 260, 3090 (1985) により既に報告されている。その配列からサッカロマイセス・セレビジェの TEF1 構造遺伝子増幅用 PCR プライマーが合成できる。

【0020】

サッカロマイセス・セレビジェ及びキャンディダ・マルトーサの染色体 DNA は市販の試薬等を用いて分離できる。分離したサッカロマイセス・セレビジェの染色体 DNA を PCR の鋳型とし、上記の合成した DNA プライマーを用いて PCR を行うことにより、それぞれプライマーの組み合わせでサッカロマイセス・セレビジェの ACT1、GAP3、PMA1、TEF1 構造遺伝子の一部分を増幅することが可能である。増幅した DNA 断片を放射性化合物或いはアルカリフォスファターゼなどで標識する事により、ハイブリダイゼーションの検出プローブとする事ができる。

【0021】

キャンディダ・マルトーサの染色体 DNA を分離し、適当な制限酵素で断片化し、アガロースゲル電気泳動後、上記検出プローブとサザンハイブリダイゼーションを行って、それぞれ目的とするプロモーター配列を含むと考えられる断片の長さを推定できる。各プロモーター毎に前記サザンハイブリダイゼーションに使

用した制限酵素でキャンディダ・マルトーサの染色体を切断処理し、クローニングベクターを用いて遺伝子ライブラリーを作製できる。このライブラリーを抗生物質を含む寒天培地上に適当数コロニーが出現するように形質転換した後、ニトロセルロース膜上で培養し、この膜をアルカリ変性、次に中和、続いて洗浄、乾燥した後、ハイブリダイゼーションを行うことによりキャンディダ・マルトーサのそれぞれのプロモーターを含む染色体DNA断片をクローニングする事が可能である。ここで得られるDNA断片はプロモーター領域だけでなく構造遺伝子も含んでいる。そこで、サッカロマイセス・セレビジェなどの塩基配列が既知の対応するプロモーターや構造遺伝子との塩基配列の類似性（相同性）から判断し、一般的な手法を用いて、プロモーター領域の同定や構造遺伝子との分離を行い、プロモーターの塩基配列を決定することができる。

【 0 0 2 2 】

以上の手法により、キャンディダ・マルトーサにおける本発明の新規なACT 1 遺伝子プロモーター、GAP 3 遺伝子プロモーター、PMA 1 遺伝子プロモーターおよびTEF 1 遺伝子プロモーターを得ることができる。これらプロモーターの塩基配列を、それぞれ、配列番号9, 10, 11, 12に示す。本発明において、キャンディダ・マルトーサにおいて機能しうるプロモーターは、上記配列番号9, 10, 11または12で示されるプロモーターだけでなく、プロモーター活性を有する限り、上記配列を含むDNAからなるプロモーター、或いは、上記配列において、少なくとも1個の塩基の欠失、置換、付加等の変異が生じたDNAからなるものであってもかまわない。

【 0 0 2 3 】

本発明の上記プロモーターは、上述した手法を用いて得ても良いし、塩基配列が同定されたことから、化学的に合成して得ることも可能である。

【 0 0 2 4 】

(2) プロモーター機能の解析

新規プロモーターの機能解析は、同プロモーターによって転写されるmRNAや同mRNAから翻訳される遺伝子産物を定量する事によって行うことができる。

【0025】

本発明のプロモーターは、その下流に構造遺伝子を連結させることで、該構造遺伝子の機能を発現させることができる。さらに、必要であれば、本発明のプロモーター、およびその下流に連結された構造遺伝子に、ターミネーターを加えた遺伝子発現ユニットとして用いることができる。ここで、用いられるターミネーターとしては、目的とする発現系で使用しうるものであれば、適宜公知のターミネーターを使用することができる。また、前記遺伝子発現ユニットをプラスミドに組み込んで利用することもできる。

【0026】

本発明において、上記プラスミドを、発現系となる宿主細胞に導入して形質転換細胞を作製し、これら形質転換細胞を培養して、導入した構造遺伝子を発現させることができる。また、プラスミドを導入するのではなく、本発明のプロモーターとその下流に連結された構造遺伝子からなるDNAを、直接宿主の染色体に組み込んでもかまわない。ここで用いられる宿主としては、本発明のプロモーターが機能するものであれば特に限定されないが、いうまでもなく、本発明のプロモーターは、キャンディダ・マルトーサを宿主として機能しうるプロモーターである。

【0027】

本発明のプラスミドのキャンディダ・マルトーサへの形質転換は、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法 (E. M. Lederberg, et al., J. Bacteriol., vol 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1. 8. 4項, 1994年) 等を用いることができる。また、Fast TrackTM-Yeast Transformation KitSM (Geno Technology) のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

【0028】

得られた形質転換体を用いての新規プロモーターの機能解析は、同形質転換体が資化できる炭素源を用いて培養して行うことができる。一例として (1) でク

ローニングしたそれぞれのプロモーター領域を用いて、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP (3HB-co-3HH) の合成に関与する酵素遺伝子 (以下ORF2Sと略す) 発現ベクターを構築し、同酵素活性を以下の文献の方法により測定可能である (Valentin, H. E., et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1., vol 40, 699, (1994))。

【0029】

本発明のプロモーターのうち、ACT1遺伝子プロモーター、PMA1遺伝子プロモーターおよびTEF1遺伝子プロモーターは、いずれも生育に不可欠な遺伝子のプロモーターであり、従って、炭素源の種類に制限されず、キャンディダ・マルトーサが生育しうる条件であれば、機能しうるプロモーターである。またGAP3遺伝子プロモーターは解糖系の酵素のプロモーターであり、特に炭素源としてグルコースを用いた場合に非常に強力な発現が期待できるという点で従来のプロモーターにない性質を有している。

【0030】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【0031】

(実施例1) 酵母染色体DNAの調製

サッカロマイセス・セレビジェ及びキャンディダ・マルトーサの染色体DNAは、E. Z. N. A. Yeast DNA Kits (OMEGA BIOTEK社製) を用いて調製した。調製方法は、同Kitに付属する説明書に従った。

【0032】

(実施例2) サッカロマイセス・セレビジェのACT1、GAP3、PMA1、TEF1遺伝子断片の増幅

既に塩基配列が明らかにされているサッカロマイセス・セレビジェのACT1、GAP3、PMA1、TEF1遺伝子断片の増幅は以下のように行った。実

施例1で調製したサッカロマイセス・セレビジェ染色体DNAを鋳型として、ACT1用には配列番号1及び2、GAP3用には配列番号3及び4、PMA1用には配列番号5及び6、TEF1用には配列番号7及び8に示した合成DNAをプライマーとして、TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ（宝酒造製）を用いてPCRにより増幅させた。その条件は、同Kitに付属する説明書に従ったが、詳しくは、鋳型DNA 1 μ g、それぞれ終濃度1 μ Mの2種類のプライマー、2.5 UのEx Taq ポリメラーゼ、付属するBufferを0.01 ml、付属するdNTP混合液を0.008 mlに水を加えて0.1 mlとした。これを98℃15秒-55℃1分-72℃1分として25サイクルのPCRを行って、サッカロマイセス・セレビジェの約400 bpのACT1遺伝子断片、或いは約1 kbのGAP3遺伝子断片、或いは約2.8 kbのPMA1遺伝子断片、或いは約1.5 kbのTEF1遺伝子断片を増幅させた。

【0033】

（実施例3）標識プローブ断片の調製、ハイブリダイゼーション、洗浄、陽性クローンの検出

増幅させたそれぞれのプローブ断片は、アマーシャムファルマシア社製Gene images AlkPhosキットを用い、付属する説明書に従ってアルカリフォスファターゼにより標識した。

【0034】

ハイブリダイゼーションはアマーシャムファルマシア社製Gene images AlkPhosキットを用い、付属する説明書に従って55℃で一晩行った。

【0035】

洗浄は、アマーシャムファルマシア社製Gene images AlkPhosキットを用い、付属する説明書に従って55℃及び室温で行った。

【0036】

陽性クローンの検出は、アマーシャムファルマシア社製CDP-Starキットを用い、付属する説明書に従って行った。

【0037】

(実施例 4) キャンディダ・マルトーサ A C T 1 遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例 1 で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体 D N A を制限酵素 B g 1 I I で切断し、アガロースゲル電気泳動にて約 1 k b ~ 3 k b の断片をゲルから抽出した。この断片を p U C 1 9 を制限酵素 BamHI で処理したものと連結し、大腸菌 (E. c o l i) D H 5 α 株に形質転換した。同形質転換株約 3 0 0 0 個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェ A C T 1 遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、6 株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の部分塩基配列を決定したところ、キャンディダ・マルトーサの A C T 1 プロモーター領域を含む遺伝子であった。クローニングした断片の一部配列を配列番号 9 に示した。

【0038】

(実施例 5) キャンディダ・マルトーサ G A P 3 遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例 1 で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体 D N A を制限酵素 E c o R I で切断し、アガロースゲル電気泳動にて約 7 k b ~ 9 k b の断片をゲルから抽出した。この断片を p U C 1 9 を同制限酵素で処理したものと連結し、大腸菌 (E. c o l i) D H 5 α 株に形質転換した。同形質転換株約 2 0 0 0 個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェ G A P 3 遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、2 株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の部分塩基配列を決定したところ、キャンディダ・マルトーサの G A P 3 プロモーター領域を含む遺伝子であった。クローニングした断片の一部配列を配列番号 1 0 に示した。

【0039】

(実施例 6) キャンディダ・マルトーサ P M A 1 遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例 1 で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体 D N A を制限酵素 X b a I で切断し、アガロースゲル電気泳動にて約 2 k b ~ 4 k b の断片をゲルから抽出した。この断片を p U C 1 9 を同制限酵素で処理したものと連結し、大腸菌

(E. coli) DH5 α 株に形質転換した。同形質転換株約5000個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェPMA1遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、5株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の塩基配列を決定したところ、配列番号11に示すようにキャンディダ・マルトーサのPMA1プロモーター領域を含む遺伝子であった。

【0040】

(実施例7) キャンディダ・マルトーサTEF1遺伝子プロモーター領域のクローニング

実施例1で調製したキャンディダ・マルトーサの染色体DNAを制限酵素EcoRI及びPstIで切断し、アガロースゲル電気泳動にて約2kb~4kbの断片をゲルから抽出した。この断片をpUC19を同制限酵素で処理したものと連結し、大腸菌(E. coli) DH5 α 株に形質転換した。同形質転換株約400個をアルカリフォスファターゼで標識したサッカロマイセス・セレビジェTEF1遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、7株の陽性クローンが得られ、挿入されていた断片の塩基配列を決定したところ、配列番号12に示すようにキャンディダ・マルトーサのTEF1プロモーター領域を含む遺伝子であった。

【0041】

(実施例8) ポリエステル合成に関与する遺伝子の合成

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャピエの由来のPHA合成酵素(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69 (1999))のアミノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を合成した。キャンディダ・マルトーサはCTGコドンでロイシンではなくセリンに翻訳する酵母であるため、ロイシンコドンにはCTGを割り当てなかった。各アミノ酸に対応するコドンはキャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択した。コドンの使用頻度はKlaus Wolf著のNonconventional Yeast in Biotechnology (Springer出版)を参考にした。

このようにしてPHA合成酵素遺伝子（以下ORF2Sと略す；配列番号13）を設計し、ORF2S遺伝子部分を全合成した。

【0042】

（実施例9）キャンディダ・マルトーサALK1プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

前記ORF2Sをキャンディダ・マルトーサで発現させるため、5'上流にキャンディダ・マルトーサのAlk1遺伝子のプロモーターALK1p（配列番号15）を、また3'下流にキャンディダ・マルトーサのAlk1遺伝子のターミネーターALK1t（配列番号14）を連結した。プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためにPCR法を利用した。プロモーター部分は配列番号15を鋳型にして配列番号16と配列番号17を用いて行い、5'末端がPvuII、3'末端がEcoRIのALK1p断片を作製した。ターミネーター部分は配列番号14を鋳型にして配列番号18と配列番号19を用いて行い、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1t断片を作製した。pUCNT（WO94/03613に記載）のPvuII、EcoRI部位にALK1p断片を連結し、またpUCNTのHindIII、SspI部位にALK1t断片を結合してpUAL1を構築した。次にpUAL1のNdeI、PstI部位にORF2S断片を結合し、プラスミドpUAL-ORF2S（図1）を構築した。次にこのプラスミドをSalIで部分分解し、XhoIリンカー（宝酒造社製）を用いてSalI部位をXhoI部位に変換した。一旦、PvuI及びPvuIIで切断し、pSTV28（宝酒造社製）のPvuI及びSmaI断片と連結し、図2に示したpSTV-ALK1ORF2Sを構築した。更にpUTU（M. Ohkuma, et al, J. Biol. Chem., vol. 273, 3948 (1998)）とキャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子（Genebank D00855）を用いて、マーカー遺伝子をウラシルからアデニンに変更したベクターであるpUTA1（図3）を使用した。その構築は、pUTU1からXhoIを用いてURA3遺伝子を除去し、これにSalIを用いて切り出したADE1遺伝子断片を接続し構築した。pSTV-ALK1ORF2SからEcoT22I

を用いてプロモーター及びORF2S及びターミネーターを含む断片を調製し、pUTA1のPstI部位に挿入して図4に示したpUTA-ALK1-ORF2Sを構築した。

【0043】

(実施例10) キャンディダ・マルトーサACT1プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

実施例4でクローニングしたキャンディダ・マルトーサACT1プロモーター領域を用いたORF2S発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号20及び21に示す合成DNAをプライマーとし、キャンディダ・マルトーサACT1プロモーター領域を含む断片(配列番号9)を鋳型としてPCRを行い、5'側末端が制限酵素EcoT22I、3'側末端が制限酵素NdeIとなる断片を得、この断片をEcoT22I及びNdeIで処理した。pSTV-ALK1-ORF2Sを同じくEcoT22I部分分解及びNdeIで処理し、ALKプロモーターを除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-ACT1ORF2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素EcoT22Iで処理し、ACT1-ORF2S断片を調製した。この断片をpUTA1のPstI部位に挿入して図5に示したpUTA-ACT1-ORF2S発現ベクターを構築した。

【0044】

(実施例11) キャンディダ・マルトーサGAP3プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

実施例5でクローニングしたキャンディダ・マルトーサGAP3プロモーター領域を用いたORF2S発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号22及び23に示す合成DNAをプライマーとし、キャンディダ・マルトーサGAP3プロモーター領域を含む断片(配列番号10)を鋳型としてPCRを行い、5'側末端が制限酵素XhoI、3'側末端が制限酵素NdeIとなる断片を得、この断片をXhoI及びNdeIで処理した。pSTV-ALK1-ORF2Sプラスミドを同じくXhoI及びNdeIで処理し、ALKプロモーターを除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-GAP3OR

F2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素XhoI及びSalIで処理し、GAP3-ORF2S断片を調製した。pUTA1プラスミドをSalIで処理し、これらを連結することによって図6に示したpUTA-GAP3-ORF2S発現ベクターを構築した。

【0045】

(実施例12) キャンディダ・マルトーサPMA1プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

実施例6でクローニングしたキャンディダ・マルトーサPMA1プロモーター領域を用いたORF2S発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号24及び25に示す合成DNAをプライマーとし、キャンディダ・マルトーサPMA1プロモーター領域を含む断片（配列番号11）を鋳型としてPCRを行い、5'側末端が制限酵素XhoI、3'側末端が制限酵素NdeIとなる断片を得、この断片をXhoI及びNdeIで処理した。pSTV-ALK1-ORF2Sプラスミドを同じくXhoI及びNdeIで処理し、ALKプロモーターを除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-PMA1-ORF2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素XhoI及びSalIで処理し、PMA1-ORF2S断片を調製した。pUTA1プラスミドをSalIで処理し、これらを連結することによって図7に示したpUTA-PMA1-ORF2S発現ベクターを構築した。

【0046】

(実施例13) キャンディダ・マルトーサTEF1プロモーターによるORF2S発現ベクターの構築

実施例7でクローニングしたキャンディダ・マルトーサTEF1プロモーター領域を用いたORF2S発現ベクターの構築は、以下のように行った。配列番号26及び27に示す合成DNAをプライマーとし、キャンディダ・マルトーサTEF1プロモーター領域を含む断片（配列番号12）を鋳型としてPCRを行い、5'側末端が制限酵素XhoI、3'側末端が制限酵素NdeIとなる断片を得、この断片をXhoI及びNdeIで処理した。pSTV-ALK1-ORF2Sプラスミドを同じくXhoI及びNdeIで処理し、ALKプロモーター

を除く断片を調製した。これら2個の断片を連結して、pSTV-TEF1ORF2Sを構築した。同プラスミドを制限酵素XhoI及びSalIで処理し、TEF1-ORF2S断片を調製した。pUTA1プラスミドをSalIで処理し、これらを連結することによって図8に示したpUTA-TEF1-ORF2S発現ベクターを構築した。

【0047】

(実施例14) キャンディダ・マルトーサの形質転換株の分離

キャンディダ・マルトーサ AC16株(独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター 寄託番号FERM BP-7366)への形質転換はエレクトロポレーション法にて行った。YPD培地にて30度Cで一晩前培養した培養液の1mlを同培地100mlの入った500ml容坂口フラスコに接種し、30℃にて約7時間培養した。3000rpmで室温、10min遠心した後、氷冷した1Mソルビトール溶液約50mlで3回洗浄した。3mlの同溶液に細胞を懸濁し、0.1mlずつ分注して-80℃にて保存し、形質転換用細胞とした。遺伝子導入にはECM600M(BTX社製)を用いた。詳しくは同形質転換用細胞0.1mlに対し構築した発現ベクターDNAそれぞれ約1μgをギャップが2mm幅のキュベットに入れ、モード2.5kv、電圧1.9kv、抵抗246Ωの条件で電気パルスをかけ直ちに氷冷後、0.5mlの1Mソルビトールを添加し室温に1時間保温した後、YNB選択プレート上で30℃にて培養した。選択プレートとしては、0.67w/v%Yeast Nitrogen Base without amino acid(Difco社製)、2w/v%グルコース、2w/v%Bacto Agar(Difco社製)を用いた。

(実施例15) プロモーター機能の解析

実施例14で得られた形質転換株を0.67w/v%Yeast Nitrogen Base without amino acid(Difco社製)、2w/v%グルコースで一晩前培養した後、その2.5mlを同培地50mlの入った500ml容坂口フラスコに接種し、30℃にて24時間培養した。比較例としたALK1プロモーターによる発現ベクターの培養のみ、炭素源とし

て2w/v%のn-ドデカンを用いた。そのうち約10ml相当の培養液を3000rpmで室温、10min遠心した後、生理食塩水で洗浄、同条件にて再度遠心した。この菌体を1mlの0.5M リン酸カリウム溶液(pH7.2)に懸濁し、同量の酵母破碎用ガラスビーズ(0.45mm、Biospec Products社製)と混合し、Mini BeadBeater(Biospec Products社製)で1minずつ5回処理して細胞を破碎し、卓上遠心器にて3000gで10秒間遠心して上清を分取してORF2S活性測定用サンプルとした。同サンプルを用いて、Protein Assay キット(BioRad社製)による蛋白質濃度測定及びValentin, H. E., et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol 40, 699, (1994)に示される酵素活性の測定を行った。

同酵素活性は、上記文献に示されるように比活性(U/mg)で表示される。その結果を表1に示した。この結果から本発明によりクローニングされたACT1、GAP3、PMA1、TEF1プロモーター領域がキャンディダ・マルトース細胞内でALKプロモーターと同等又はそれ以上の効率で機能するプロモーターであることが分かった。

【0048】

【表1】

| プロモーター | 酵素活性 (U/mg) |
|--------|-------------|
| ACT1 | 0.021 |
| GAP3 | 0.018 |
| PMA1 | 0.020 |
| TEF1 | 0.025 |
| ALK1 | 0.021 |

【0049】

【発明の効果】

本発明により、キャンディダ属酵母、特にキャンディダ・マルトースにおいて有用遺伝子発現を高効率に行うことが可能となった。

【0050】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KANEKA CORPORATION

<120> A new promoter

<130> TKS-4734

<160> 27

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-ACT1 5'

<400> 1

ccggaattca tggattctgg tatgttcta

29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-ACT1 3'

<400> 2

ccggaattca agacagcacg aggagcgtc

29

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-GAP3 5'

<400> 3

atgatcagaa ttgctattaa cggtttcggt

30

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-GAP3 3'

<400> 4

ttaagccttg gcaacatatt cgatcaagt

29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-PMA1 5'

<400> 5

atgactgata catcatcctc ttcacatcc

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-PMA1 3'

<400> 6

ttaggtttcc ttttcgtgtt gagtagagac

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-TEF1 5'

<400> 7

atgggtaaag agaagtctca cattaacgtt

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Sc-TEF1 3'

<400> 8

ttatttctta gcagcctttt gagcagcctt

30

<210> 9

<211> 1300

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-ACT1 Promoter

<400> 9

gatctcggct gtgaatcgca atttgccatg acacctctcg ctatttccga attacataag 60

accatcagtg aaagattgga gagaaaaaaa tgtgaacaga atagtcggag tttatattaa 120
 attcatcgtc caaaaaaacc tgaatatcat tggctctgcg gtttattaaa aagtgtaccg 180
 ccgacttata cgaacaatta aacgtaacat gactgcaaaa aaaaaccatg aagaaaacat 240
 ttacaaaata tttgtaatat cgtcgaagat aataaacat accagacgga aagttggatg 300
 aaattgttgc aaaaataatt atgctactcg ttctcacgtt taaatataca cgtagatcaa 360
 accagcaaac ttctataaat tgccatcgat ccaccaaaca tcgtcaaaaa caattttgta 420
 actttattgc ctctcatacg tttaaatttc aaaatcaata aatattaatc aaccgtgtaa 480
 caaaaaaaaa aaactgagat agtgcacagc ccaaaaaggt ttagtgattg cctccaaaca 540
 tacataatag gttatttttt tcgttgaacg catttcttgc tcgctcaccg aatttctgcc 600
 aacgaaacaa attttatata ttctattttt ttctctttca tgtaattttt tctttctttc 660
 tgctttttct ttttttttc ttttccttcc caatcccccc ctacattaat atattaatta 720
 tcatttaaaa tggacggtgg tatgtttaaa ctatttcatt gacttgattg atcgattgat 780
 tgattggttg atttcttcaa agcacggact tttttcttt ctccattatt tgatttttag 840
 attttgggtg atttttttgt ttttttggg gagtgactga tctaattctca attcaggatt 900
 atgggacgaa gaagaatcga gagatggaat ctagatatat caatttcaat tttattgtt 960
 ttgatctcga gagtatttat ggaaagattt gattgaacaa cttttttttt cattggcctg 1020
 gatcaattcc gtccataaaa gaaagagagc ttacactga tcgattcatt catatttttt 1080
 aactggagt ttcttcaaaa atcattggat tctaccaat ggcaatccta catcttaaaa 1140
 atcatcattt attacgagtt tattggataa tggtcacttt aaattcttgg tatcttgaat 1200
 ttgttttttt ttttttttt tttcagaaat ttgtaccccc ttttaaaaat gttcagaatt 1260
 tttttttttt tttcgtcaaa cccacacaca cacatttttc 1300

<210> 10

<211> 3000

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-GAP3 Promoter

<400> 10

ctgcagggtg gatcttcaga ctgtttaata tttcttcaat atgatgggtc ccataattag 60
 aaacccaat actcttaaca atccccttg acacggcttc ttccatgact ttccaacttt 120
 ccaatcgitt ftgtttccca ggtaatgggtg aatggatcaa taacaaatcg atatatttca 180
 aatcaccaat ttgatccaac atagtagtga tgcgatgtct tgtatttggt gtaccaatt 240
 gactattcca tagtttggtg gtatagaaaa actctgaacg agggatatct ggattatcgt 300
 gaaggaattt cgttatccct tctgccactt cttcttcgtt gccgtacaaa actgcggtat 360
 caaaatgtcg atatccgact ttacaggctt cgtagacaat gctggccgtt ttatttcttg 420
 gaatgtcgta acagcctaaa ccgattgaag ggatgctata tccggaattg agtttgatta 480
 atcgaaatga catgattgtg ttgagtatat tgaaagcaat aattaatata aaaaaagag 540
 gaacgaaaaa aaagagagat gttgaagtgg ttgggttatg taagtacgta tttattcact 600
 gattattaat tgctatctta ataataattt tttccctccc atttttactt tttttgata 660
 tcttgtttga aatgtggggg caaaaaaaaa aaaaatttac atagccctat tccataaaat 720
 ataaatcttt tatgtatatt tgcaacatcg acacaatttg atatttccaa atactccagg 780
 tttttttttc ttttcatc acagtctcgg gattaagtgt gaaacccggg ggaaatcgaa 840
 attttttttt ttcagcattg tttatacaca atttcagttt gtccgaatac accgcacgt 900
 gattcccca aacaggcaaa aaaaaaaaaa aatgaatata tagtgagtac gtgtcccgcg 960
 gctcaggaac ctcttttttt tttagagggtg gtatgatgtg aagtattttt ttttttct 1020
 ttttctttt ctttttcat tcacaccacc accatataga atttacttac gtcaggttat 1080
 attctagaca accttgtgg ttttttttt taaagggaat ttgagccact atgtccatag 1140
 aaaacttttt actgtaacga aaatctatag tctgagataa aggggaaaat ggtaaccacg 1200
 tattttttta ttttttttg gattcctata acccgatat ttatgttcgg aattgtagat 1260
 atatagatat tccagattac ttggctgtaa ttaggctat ggaaatgata ctactcatca 1320
 atataaacc attgacagta taagatagat aattatactg tgggtggtacc atataaaatt 1380
 aatatgttga tcagggtgctt ttggcaacac cacgagcttt gcgcaagttt ttttttttg 1440
 ttcttttttg tttttgttg gttgtttgat gcaaatggat gataatgcc cgggcgcggg 1500
 cgtgtgtgac gcaaatccaa tagaaaaaat tcacctggtt aaacctattt tctactgcaa 1560

atcaatttat ttgccaataa gaaaaaaaga atatataata acccttgaat gtccaattgg 1620
 aatTTTTTTT ctctttctaa aatTTTTtct tctttctttc ttttcttctt cttttcttct 1680
 ttacacaatc aattgacttt aaacctcaat taaacaacac ataactttca aacttacttt 1740
 ttaacataca aaaaatggct attaaaattg gtattaacgg tttcggtaga atcggtagat 1800
 tagtcttgag aattgcttta ggcagaaaag acattgaagt tgttgccgtc aacgatccat 1860
 tcattgctgc tgattacgct gcttacatgt tcaaatacga ttccaccac ggtagatata 1920
 aagggtgaagt caaatctgaa ggtaacgatt tagtcattga cggtaagaaa atccaagtct 1980
 tccaagaaag agaccagct aacattccat ggggtaaaga aggtgttgaa tatgttattg 2040
 actccactgg tgttttcacc aagattgaag gtgctcaaaa acacattgat gctggtgcca 2100
 aaaaagttat catcactggg tcatctgctg atgctccaat gttcgttggt ggtgttaacg 2160
 aagacaaata caccacagac ttgaaaatca tttctaacgc ttcctgtacc actaactgtt 2220
 tagctccatt agctaaagtt atcaacgata ctttcggaat tgaagaaggt ttgatgacca 2280
 ctgtccactc catcactgct acccaaaaaga ctgttgacgg tccttcccac aaagattgga 2340
 gaggtggtag aactgcttcc ggtaacatta tccatcttc tactggtgct gctaaagccg 2400
 tcggtaaagt tatccagaa ttaaaccgga aattgactgg tatgtctttg agagttccaa 2460
 ccaccgatgt ctccgttggt gacttgactg tcagattatc taaaccaacc acttacgaag 2520
 aaatctctga agctatcaag aaagctgctg atggtccatt gaacggaatc ttgggttaca 2580
 ctgaagatgc tgttgtctct actgacttct tgtcttctaa ctactcttct gtttcgatg 2640
 ctaaagctgg tatcttggtg tcccaactt tcgtcaaatt gatctcttgg tacgataacg 2700
 aatacggta ctctaccaga gttgtcgact tattggaaca cgttgccaaa gttccgggt 2760
 cctcttaact cagaaacaag ttttagttga cattgtgtct gttttctttt attacatagg 2820
 ttgttatatc aatatatgtt tataaatacg tcttgaaaat cttgtttttt tttttgtaa 2880
 attttgtaaa ttttcatctt gtgcgggaca aaggacgagt ggagaaaaaa aaaacgaaac 2940
 ttttttttc ttttctccga aattgtaaac aaaaacaaca acaacacctc catgtcggaa 3000

<210> 11

<211> 3173

<212> DNA

<213> *Candida maltosa*

<220>

<223> Cm-PMA1 Promoter

<400> 11

```
tctagaattt atattggttt ctttcttttt ttttagatcg tttattaatt aattagttaa 60
ttaattactt cataacatgt aaattagatt taaccaaaaa aaagaaaagt taaagataat 120
ggctaagtag atgttaaagc cagggtcaat tgtttataat actcatcatc atcaatcaat 180
taaattgcaa aaacaaacaa acccgttgaa aaaaggaaag aaaaaaaaaa cacggctggt 240
aataaatctt tcatgtactg gtcaattaat taaccgacgt aataagagat ctttgataa 300
atagtaagaa tatccagcaa tttacgtacg taaatgaaac acaaatgaat gaatgctgaa 360
ctttcatgac ttaattgagt agtttagttg gttggtatat gcgaaattta tttattccga 420
taattattat caataggttg tagcgggaaa tttaaaacca aacaggagat tagaagcggc 480
agaatgaaat aaaaaaaaaa atggccggcg aaaaaaaaaa ggaaaaaaag gaaggaaaaa 540
aaaacgaaaa agggctgggt aaatctactc acaaatattt ataataatga ttgtttattt 600
atctatggat gtttgatga attaagtcaa gtttgtgtta tttcgtatga aagagacata 660
gtagagata gagatagata gacaaataga ttgagagat gaggtggttc agttacatta 720
catttttttt tcttaaaaac taaaaatatt tcttatgtaa ctttccagtt tattatatta 780
ataccaagaa agttatatgt aatatcagtt gatattcaac aattgctggt acaattgtca 840
actctcaact tctaccttcc catttgaata tctctcttcc agtcatatga gttgtattca 900
aaattttttt tatttccgtt cggcataatt aattttgtgt cgtgggaata tgcacaattt 960
ataaaacaaa agcaaaatct aaattgaggg aatttctgca gaagagtcaa aaaaaacata 1020
aagtcgtgtc tcggaactca aaaataacat tttccatact aagattaaac gataacattt 1080
aaaaaaaaatcc acaaatgtga ttggtcggaa taaaaaataa aaatatccct caccctaaag 1140
aaagaaaatt tttttattta gttgagaaaa ccgaataatt ttgtcctatg aggtaattaa 1200
atatttccat tttgtgttat tgtttattat tttcctaaac cactttatca aaaaaagaaa 1260
aagaaatfff tcttcttttt tggacaaaat taaaaatfff ttacaacctc ttctaataaaa 1320
gaaaaacaac aacaacagaa aaacgacctc caaaaaaatc ttacaaccaa aaatttaaatt 1380
```

ttttaatttt ccaaaggtaa tataaaaagg ataataaatt cccttgatta gatttttttt 1440
 ttttaacgaat tctttattca tttttccttt ttcccttttt ttttttttcc tttttttaga 1500
 tagtcaatcg aagttttact tttattaact ttttttecta cccactaatt cttactttct 1560
 tttttttttc attcaaaaat tttttaatag tattttaaaa aatataccat ctcacacccc 1620
 caaaaaagaa aaataaaaag gaattcattt ttaataccct aattttttta tattagaatt 1680
 atagagagag aaaaagagac agaaaacaaa aacttatcat gagtgctact gatcctacta 1740
 atgaaaagat caataaagac atctccgatg atgaagatga agatattgat caattgggtt 1800
 tagatttaca atctaattca ggtgctttag atgacgaaga agaagaagaa gatcaagctt 1860
 cttttaaagc cgtccctgaa gaattattac aaactgaccc aagaactggt ttatctgatg 1920
 atgaagtcca aaaaagaaga aaaaagtatg gtttgaatca aatggctgaa gaacaagaaa 1980
 atttagtcat gaaattcgtc atgtttttcg ttggtccaat tcaattcgtt atggaagccg 2040
 ctgctgtttt agctgctggt ttggaagatt gggtcgattt tgggtgttatc tgtgctttat 2100
 tgggtattgaa tgcttttggt ggtttcatcc aagaatacca agctggttct attgtcgatg 2160
 aattaaaaaa gacttttagct aacgttgctt tagttgtag aaatgggtcaa ttggttgaaa 2220
 ttccagccaa tgaagttggt ccaggtgata tcttgcaatt ggaagatggt accgttatcc 2280
 caactgatgg tagaattggt tctgaagatt gtttattaca agttgatcaa tctgctatta 2340
 ctggtgaatg ttagctggt gacaaaagat ctggtgactc ttgttactct tcttccactg 2400
 ttaaaaactgg tgaagctttt atggttggtt ccgctactgg tgacaacact tttgttggtt 2460
 gagctgctgc ttagtcaac aaagcttccg ctggtactgg tcatttcact gaagttttga 2520
 acggtattgg tactacattg ttggttttcg tcattgttac tttgttggtt gtctgggttg 2580
 cttgtttcta cagaactggt agaattgttc caatcttgag atacactttg gctatcacca 2640
 ttattgggtg tccagtcggt ttaccagctg tcgttaccac taccatggct gtcggtgctg 2700
 cttacttggc taaaaaacia gctattgtcc aaaaattgtc tgctattgaa tctttggctg 2760
 gtgtcgaaat tttatgttct gataaaaactg gtactttgac caagaataaa ttgtctttac 2820
 atgaaccata cactgttgaa ggtgttgaa cagatgactt gatgttgact gcttgtttgg 2880
 ctgcttccag aaagaagaag ggtttggatg ctattgataa agctttcttg aaatctttga 2940
 ttaactaccc aagagctaaa gctgctttac caaaatacaa agttattgaa ttccaacctt 3000
 ttgatcctgt ctccaaaaaa gttactgcc a ttgtgaatc accagaagg gaaagaatta 3060
 tttgtgttaa ggggtgctcca ttattcgtct tgaagactgt tgaagatgcc catccaatcc 3120

cagaagatat ccatgaaaac tatcaaaaca ctgttgccga atttgcttct aga

3173

<210> 12

<211> 1675

<212> DNA

<213> Candida maltosa

<220>

<223> Cm-TEF1 Promoter

<400> 12

ctgcagcagc ttctactgct gccgctccaa cattaggtgc tgaatatact agcgggtactg 60
gtaaattagt tgggtgtggtt acattgactg atattttggg attatttgcc acatcaaaag 120
gtagaagaac tgatccacaa gctgcaagaa accaaagaag aagaagttcc acttccacta 180
cgagatcatc tgttgatagt gcattaaacg ctgaaggtgt gattaatcct tctgccacca 240
ccaccaccga tgccattcct ggtaataaca attctagtcg tagagaaagt gttgatgctt 300
caagtgatgt tttcagaaaa tcatttacta aacccaaga aaatgtattt tccaaagagt 360
aagggttcct tctttcataa caaaaaaaga aaaacaatca cggatttatt tattttattg 420
caatgctatt tataatatat ttgttagata aaaacaaatg aaaaatcttg ttagctatgt 480
atactactac atatatacta caataaaaac acacaaaaat gaaacgtgtt ttgcacaatt 540
tcgcacgact cagaggcatc gcatttctgt cctttttgta cgtcattgta atttttttta 600
tgttattttt tttacagcaa gcaatccaaa aaaacaaaaa aaaaatgaga gagaaaaaaa 660
tgaggggggtt gatttaaaaa gatgggtcaaa aatatcgtg acatattaca taatcgatga 720
gtttgatatg gaacgaatat tgatggtttt ggtctgaatt gatatgggtg aagtatttgt 780
tggtgataat tttatcaaca taaactcaat tccgctcaat tgtacaaaat tgaccttctt 840
tcgccttttg ttcaatgcca ttttttccaa taattttttt tttcaaattt tgccatccag 900
caciaagaaa aaaaaaattt acatgtccga caactcaccg gtgtttctga caacaattga 960
caacaccagt ctgtagacc c aattggtaag tcaatgataa ctactacatc tacctagttg 1020

ttatctttta acttaaaatt agcaaagaaa taataatggt tatcattgaa gatggtttca 1080
 caaaattaaa cgaatacgtg tacgttttac caaaaagatt ttttttttc tctttagttt 1140
 ttttttcgtt gttcttccca tcaactgaaaa atttttctcc ctctatataa atcaatccca 1200
 tcaacgaaaa ttttttttct tcctttttga attttttttt tctccttttt ttttctcctt 1260
 tttttttctc cttttctttc ttcactaac ttatatitaa tcaatcatgg gtaaagaaaa 1320
 aactcacgtt aacgtcgttg ttattggtca cgtcgattct ggtaaactta ctaccaccgg 1380
 tcaattgatc tacaagtgtg gtggtattga caaaagaacc attgaaaaat tcgaaaaaga 1440
 agctgctgaa ttaggttaaag gttctttcaa atacgcttgg gtcttggata aattgaaggc 1500
 tgaaagagaa agaggatatca ccattgatat cgctttgtgg aaattcgaaa ctccaaaata 1560
 ccacgttacc gttattgatg ctccaggatca cagagatttc atcaaaaata tgattactgg 1620
 tactttctaa gctgattgtg ctattttgat tattgctggt ggtactggtg aattc 1675

<210> 13

<211> 1794

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ORF2S

<400> 13

atg tct caa cca tct tat ggt cca ttg ttc gaa gct ttg gct cat tac 48
 aat gat aaa ttg ttg gct atg gct aaa gct caa acc gaa aga act gct 96
 caa gcc ttg ttg caa act aac ttg gat gat ttg ggt caa gtt ttg gaa 144
 caa ggt tct caa caa cca tgg caa ttg att caa gct caa atg aat tgg 192
 tgg caa gat caa tta aaa ttg atg caa cac act ttg tta aaa tct gct 240
 ggt caa cca tct gaa cca gtt att act cca gaa aga tct gat aga aga 288
 ttt aaa gct gaa gct tgg tct gaa caa cca att tat gat tac tta aaa 336

caa tcc tat ttg tta act gct aga cat ttg ttg gct tct gtt gat gct 384
 ttg gaa ggt gtc cca caa aaa tct aga gaa aga ttg aga ttc ttt act 432
 aga caa tac gtc aac gct atg gct cca tct aat ttc ttg gct act aac 480
 cca gaa ttg tta aaa ttg act ttg gaa tcc gat ggt caa aat ttg gtt 528
 aga ggt ttg gct tta ttg gct gaa gat ttg gaa aga tct gct gat caa 576
 tta aac att aga ttg act gat gaa tcc gct ttt gaa tta ggt aga gat 624
 ttg gct ttg act cca ggt aga gtt gtt caa aga act gaa tta tat gaa 672
 tta att caa tac tct cca act act gaa acc gtt ggt aaa acc cca gtt 720
 ttg atc gtt cca cca ttc att aat aaa tat tac att atg gat atg aga 768
 cca caa aac tcc ttg gtc gct tgg ttg gtc gct caa ggt caa acc gtt 816
 ttc atg att tcc tgg aga aac cca ggt gtt gct caa gct caa att gat 864
 tta gat gat tat gtt gtt gat ggt gtc att gct gct ttg gat ggt gtt 912
 gaa gcc gct act ggt gaa aga gaa gtt cac ggt att ggt tac tgt att 960
 ggt ggt acc gct ttg tct tta gct atg ggt tgg ttg gcc gcc aga aga 1008
 caa aaa caa aga gtt aga act gct act ttg ttt act act ttg ttg gat 1056
 ttc tcc caa cca ggt gaa ttg ggt att ttt att cat gaa cca att atc 1104
 gcc gcc tta gaa gcc caa aat gaa gct aaa ggt att atg gat ggt aga 1152
 caa ttg gcc gtc tcc ttc tct ttg ttg aga gaa aac tct tta tat tgg 1200
 aat tac tat att gat tct tac tta aaa ggt caa tct cca gtt gct ttt 1248
 gat ttg ttg cac tgg aac tct gat tct act aat gtt gcc ggt aaa act 1296
 cat aac tct ttg ttg aga aga tta tat ttg gaa aat caa ttg gtt aaa 1344
 ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392
 act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta tgg 1440
 caa ggt acc tgg caa ggt atg aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488
 tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att att aat cca cca gct 1536
 gct aac aaa tac ggt ttc tgg cac aat ggt gct gaa gct gaa tct cca 1584
 gaa tct tgg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc tgg tgg cca 1632
 gaa atg atg ggt ttt att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680
 cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728

gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct tgt cca acc gaa gaa gat 1776
gct gct tct aaa ttg. taa 1794

<210> 14
<211> 218
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> terminator ALK1t

<400> 14
Atagatggat ttttcttttt tatgtgtatt tccggttaat aaatgtttta attttttttt 60
taataaaaaat atttgtagtt atttatatgc aaaaaaaaaa aatattcaaa gcaatcttcc 120
tttcttttctt tatctttccc ccattgctaag gtctaaaaca ccacaactta aaacccaact 180
taaccgtata atactaagat caatctccaa agatgcat 218

<210> 15
<211> 1017
<212> DNA
<1> Candida maltosa

<220>
<223> promoter ALK1p

<400> 15
atgcatgaac aggatttaac cccaagaaaa aagtctatit tctatittca caaggaaact 60

ggaaaaacct ttttggttt tgaagtagct ccgtaataac ctgtaaaaaa ataaattttg 120
 aagatttgac ttgctgatga aaatgctatc agtgtagctc tagacttgat actagactat 180
 gatggcaaca catggtgggc aacgtgcaag acatcaccca atgagaagac tgctaaccag 240
 aaaaaaaagg ggacaaaaga aaaactcgag agaaaaagtc aaattggtgt aaaattggct 300
 atttttggtg ctttcctaata ggggaaatta attgttttaa attccagttt ttccagagtt 360
 aagatttcga ccaattattt ttaatccata tgatcttcat cattatcaac ttgtgaaaaa 420
 taataatcga ggtacgttta atacgagata ttagtctacg gctatgaatg ttggatatac 480
 ttcattgacg atcagaagct tgattggta ttccaggtgca tgtgtggata taaacccaac 540
 aaattatcta gcaactgtgc cttccccaca ttggtcaaag aaaccctaaa gcaaattaaa 600
 atctggataa ataaatcatt catttcacat tttccggtta gtataagggt ttttaaattt 660
 ttttttacag tttagccctt tcaattacca aatacggtta caatgtgctt tgtaacatgc 720
 aggggatttt ctccgttgct gttttctcca catgctttta atgtgtaata aattaaanaa 780
 attacaaaga aaaaccggca tataagcatc ggagtttaca ttgttaacta actgcaaaat 840
 ggcgatgttt caaatcaaca aaatttaaaa aaaccccaaa aaaaaagtat catataaatt 900
 aaactcaaaa tctttttgat tgcataaaat ttttaaattt cttctttttt ttctttttta 960
 ctttcttate tattctattc tttttttata tatctaattc atttataaca tctggtc 1017

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<1> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1p 5'

<400> 16

tttttcagct ggagctcgtc gacatgcatg aacaggattt aatccc

46

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<1> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1p 3'

<400> 17

ccggaattcc atatgcagat gttataaatg aattagata

39

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<1> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1t 5'

<400> 18

cggaagctta tagatggatt tttctttttt at

32

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<1> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for ALK1t 3'

<400> 19

ttttgatatc gagctcgtcg acatgcatct ttggagattg atctt

45

<210> 20

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-ACT1p 5'

<400> 20

cgcggatccg aattcgtcga catgcatgga tctcggctgt gaatcgc

47

<210> 21

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-ACT1p 3'

<400> 21

gcgggatccc atatgtatcc aataaactcg taata

35

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-GAP3p 5'

<400> 22

atggctatta aaattggtat taacggtttc ggtag

35

<210> 23

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-GAP3p 3'

<400> 23

agaagcattg gagataatct tcaagtctgg agtgt

35

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-PMA1p 5'

<400> 24

gaatatctct cttccagtca ctcgagttgt attc

34

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-PMA1p 3'

<400> 25

ctcatatgaa gtttttgttt tctgtctc

28

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-TEF1p 5'

<400> 26

gcgggacccct cgagtaaggg ttccttcttt cata

34

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer for Cm-TEF1p 3'

<400> 27

ttttctttac ccatatgtga ttaaataataa gtttagatg

38

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミド pUAL-ORF2S の簡単な図を示してある。

【図2】 プラスミド pSTV-ALK1ORF2S の簡単な図を示してある。

【図3】 プラスミド pUTA1 の簡単な図を示してある。

【図4】 プラスミド pUTA-ALK1-ORF2S の簡単な図を示してある。

【図5】 プラスミド pUTA-ACT1-ORF2S の簡単な図を示してある。

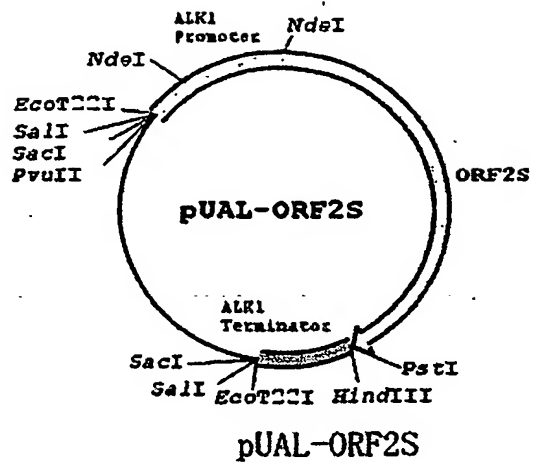
【図6】 プラスミド pUTA-GAP3ORF2S の簡単な図を示してある。

【図7】 プラスミド pUTA-PMA1ORF2S の簡単な図を示してある。

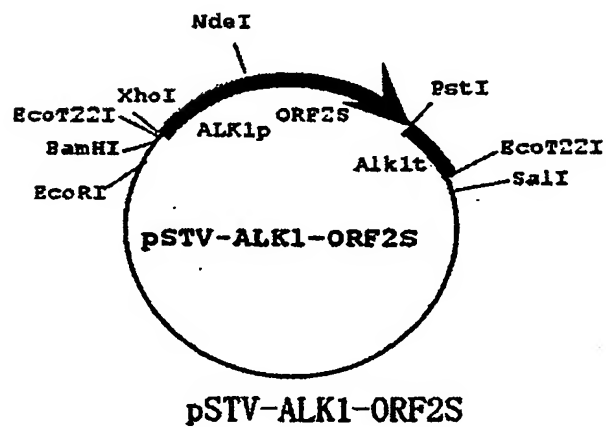
【図8】 プラスミド pUTA-TEF1ORF2S の簡単な図を示してある。

【書類名】 図面

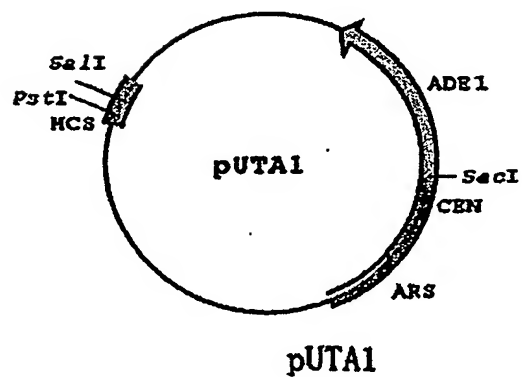
【図 1】



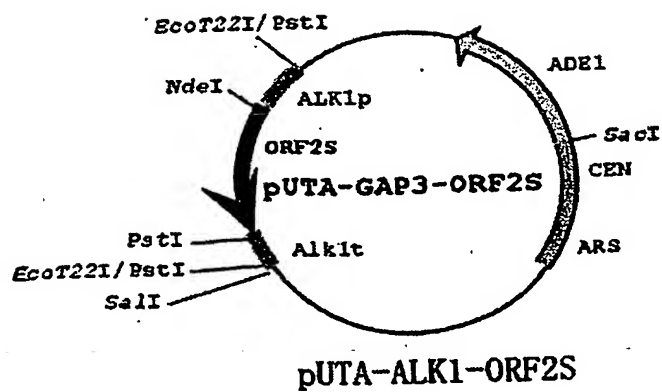
【図 2】



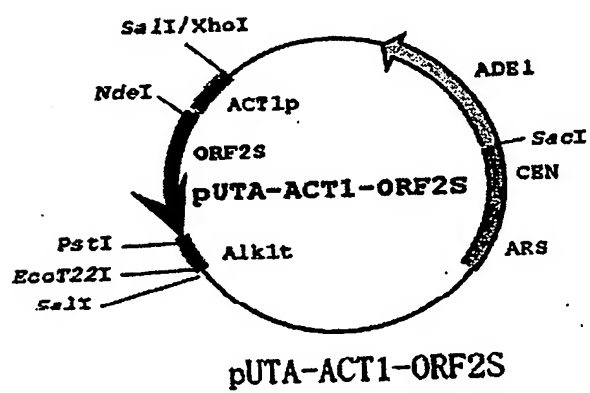
【図 3】



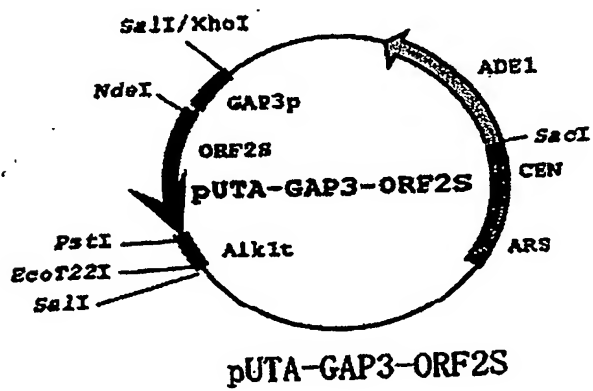
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

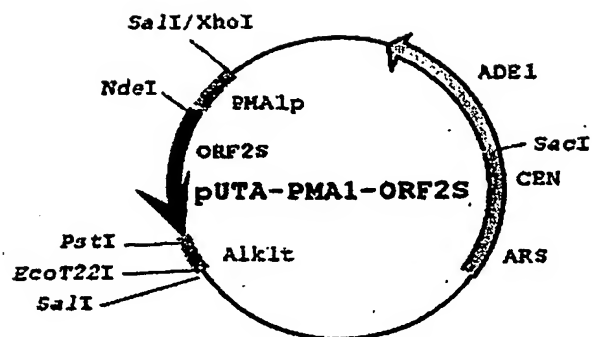


図7 pUTA-PMA1-ORF2S

【図 8】

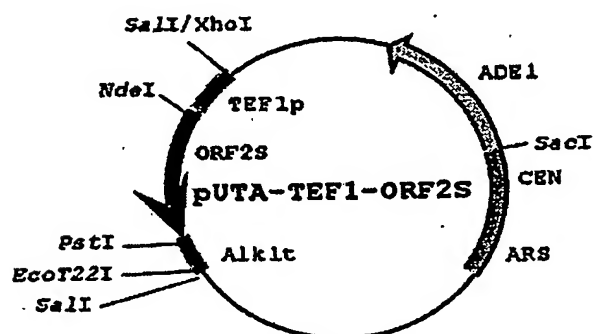


図8 pUTA-TEF1-ORF2S

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 キャンディダ属酵母において培養条件や培地条件等の誘導条件に依存することなく、有用遺伝子の発現を構成的且つ高効率に行うことができる新規プロモーターを提供すること。

【解決手段】 キャンディダ・マルトーサ由来の、配列番号 9 で示される A C T 1 遺伝子プロモーター、配列番号 1 0 で示される G A P 3 遺伝子プロモーター、配列番号 1 1 で示される P M A 1 遺伝子プロモーター、そして配列番号 1 2 で示される T E F 1 遺伝子プロモーターおよび、上記配列を含有する D N A からなるプロモーター。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月 27日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
氏 名 鐘淵化学工業株式会社
2. 変更年月日 2003年 4月 7日
[変更理由] 名称変更
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
氏 名 鐘淵化学工業株式会社
3. 変更年月日 2003年 4月 7日
[変更理由] 名称変更
住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
氏 名 鐘淵化学工業株式会社